

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „ФИЗИОЛОГИЯ НА ЖИВОТНИТЕ И ЧОВЕКА”

Биляна Мариянова Илиева

*„Инотропен ефект на обестатин върху
сърце на жаба (*Pelophylax ridibundus*). Роля
на вегетативната инервация“*

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

На дисертационен труд за присъждане на образователна и
научна степен „ДОКТОР“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ
проф. д-р Христо Гагов

София 2022

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АЦ - аденилатциклаза

ДАГ - диацилглицерол

ИТФ – инозитолтрифосфат

МАО – моноаминооксидаза

ПК А – протеинкиназа А

ПК С – протеинкиназа С

ПК G – протеинкиназа G

ФЛС λ – фосфолипаза С λ

цАМФ – цикличен аденозинмонофосфат

6 OHDA – 6-хидроксидопамин

ВН₄ - тетрахидробиоптерин

САМК II – Са/калмодулин зависима протеинкиназа II

ERK – киназа, регулируема от извънклетъчни сигнали

GHS-R 1a – growth hormone secretagogue receptor 1a

GLP-1 - глюкагоноподобен пептид 1 (ГПП-1)

GLUT-4 – глюкозен транспортер тип 4

GPR39 – G протеин-свързан рецептор 39

LDL – липопротеини с ниска лътност

HDL – липопротеини с висока плътност

3IT – 3 йодо-L-тирозин

L-допа – L-дихидрокси фенилаланин

МАРКАР-К II - mitogen-activated protein kinase-activating protein kinase II

MSK1 – mitogen- and stress-activated protein kinase

NET – норадреналинов транспортер

NO – азотен оксид

PI₃K/Akt - PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) and Akt (protein kinase B)

PRAK – p38 регулируема протеинкиназа

SERCA – саркоплазмена Са²⁺ АТФ-аза

ROS – реактивни кислородни видове

VMAT 1\2 – везикуларни моноаминови транспортери 1 и 2

УВОД

Обестатинът е открит през 2005 година от Zhang и сътр. Той е свързан с грелина пептид, който се получава след посттранслационна обработка на препрогрелината молекула. Като наскоро идентифициран медиатор той предизвиква значителен научен интерес, изразяващ се най-вече в интензивни изследвания на неговите физиологични функции.

Първоначално действието му се свързва с активирането на G-протеин свързан рецептор (GPR 39) и с подтискане на двигателната активност на стомашно-чревния тракт и приема на храна. Обестатинът, обаче остава противоречив пептид, както по отношение на храненето, така и по отношение на рецептора му, който все още е обект на дебат.

Установени са положителни ефекти на обестатина върху глюкозия и липидния метаболизъм, което предполага взаимодействието с рецептора на глюкагон-подобния пептид 1. Ролята му в сърдечно-съдовия контрол също е все още неясна и противоречива. Данните до момента сочат, че обестатинът участва в регулацията на кръвното налягане и оказва благоприятно въздействие върху ендотелната функция. Експерименталните проучвания показват, че той има кардиопротективно действие при състояния като исхемична болест на сърцето.

Освен това, обестатинът проявява различни клетъчни ефекти, като увеличава пролиферацията и инхибира апоптозата и възпалението в различни типове клетки.

Въпреки над 15 години изследвания, влиянието на обестатина върху различните органи и механизмът му на действие предизвикват много дискусии. Това се дължи както на все още неизвестния му рецептор, така и на евентуалното разграждане на молекулата му на по-малки фрагменти, за които се предполага, че имат собствени ефекти.

Подобно на грелина, обестатинът се произвежда в стомашно-чревния тракт, включително от панкреаса и от мастната тъкан. Той осъществява, както локални действия в периферните тъкани, така и отдалечени ефекти на централно ниво, което е основание да се разглежда като потенциално терапевтично средство. Така обестатинът продължава да е обект на интензивни научни изследвания.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се установи участието на вегетативните нервни окончания в ефекта на обестатина върху съкратителната активност на сърце от жаба (*Pelophylax ridibundus*) и механизма, по който това се реализира.

За постигането на тези цели бяха поставени следните задачи:

1. Да се проследи ефекта на обестатина върху максималната амплитуда на сърдечните съкращения на жаба след специфично инхибиране на катехоламиновата синтеза.
2. Да се изследва влиянието на обестатина върху сърдечната дейност на изолирано жабешко сърце след блокиране на везикуларния моноаминен транспорт.
3. Да се проследи ефекта на обестатина върху максималната сила на съкращение на изолирано жабешко сърце след блокиране на обратното захващане на адреналина.
4. Да се изследва ефекта на обестатина върху сърдечната дейност на жаба след фармакологично елиминиране на окончанията на вегетативните неврони чрез *in vitro* въвеждане на невротоксина 6-хидрокси допамин.
5. Да се изследва ефекта на обестатина върху сърдечната дейност на жаба след предварително инжектиране на 6-хидрокси допамин.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Опитна постановка

За *in vitro* опитите при изследването на обестатина след упояване и денервиране жабите бяха фиксирани по гръб в парафинирана ваничка. Сърцето беше откривано и перикардът беше почистван, включително и в основата на големите кръвоносни съдове. Сърцето беше перфузирано с около 2 ml Рингеров разтвор, с цел да се отстрани кръвта от аортата за да се избегне запушване на канюлата от образуван съсирек. Три лигатури бяха поставяни и затягани в следната последователност: първата – под аортния конус се издърпваше максимално надолу така, че част от венозния синус да остане към препарата; втората – на десния клон на аортата и третата – на левия клон на аортата. Затягането на първата лигатура преустановяваше навлизането на кръв в сърцето и с последващите няколко сърдечни удара до затягането на втората

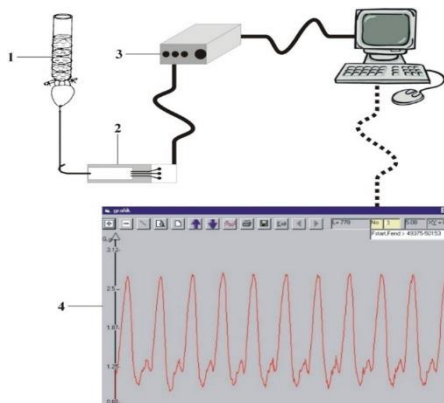
лигатура се изпомпваше останалата в сърцето кръв след промиването. Правеше се кос напречен разрез на около $\frac{1}{2}$ от диаметъра на левия клон на аортата. В този отвор беше вкарван върхът на канюлата, която беше предварително запълнена с Рингеров разтвор, преминаваше се през аортния конус и по време на систола, когато аортната клапа е отворена, се вкарваше в камерата. Третата лигатура се затягаше около канюлата и аортното разклонение над разширението на канюлата. Изрязвани бяха всички съдове и тъкани зад поставените лигатури и канюлата беше фиксирана на статив във вертикално положение. Върхът на сърцето беше захващан със серфин и беше свързван към тензодатчик GRASS FT03 (Grass Instrument Co., Quincy, USA). Той предаваше информация за съкращението чрез аналогово-цифров преобразувател към компютър.

Прилаганите *in vitro* инхибитори резерпин ($10 \mu\text{mol/l}$), дезипрамин ($1 \mu\text{mol/l}$) и 6-хидроксидопамин (6-OHDA) (10nmol/l) бяха разреждани в разтвор на Рингери прилагани в обем $200 \mu\text{l}$ в канюлата 25 минути преди въвеждането на обестатина, както и при всяко следващо приложение до края на експеримента. При *in vivo* експериментите животните бяха третираны с 3-IT в доза от $0,02 \text{mg/g}$ телесна маса и с 6-OHDA в доза $40 \mu\text{g/g}$ телесна маса. Инхибиторите бяха инжектирани в дорзалния лимфен сак един час преди изолирането на сърцата.

В края на всеки експеримент бе въвеждан $50 \mu\text{mol/l}$ адреналин, разтворен в Рингеров разтвор до краен обем от $200 \mu\text{l}$.

Регистриране на сърдечната дейност

За настоящите изследвания фирма Стокс, София, България разработи специализираната софтуерна програма TENZSU (фиг. 10). Тя позволява регистриране на сърдечата дейност и съхранение на получените данни в електронен вариант За допълнителната визуализация на получените данни беше разработена спомагателна програма TENZOGRAPH.



Фигура 10. *Опитна постановка за регистриране на сърдечните съкращения на жаба TENZSU: по абсцисата е представено времето, а по ордината – силата на сърдечните съкращения; 1 – канюла с изолирано сърце; 2 – тензодатчик; 3 – аналогово-цифров преобразувател; 4 – оригинален запис.*

Представяне на получените резултати и статистическа обработка на данните

Регистриращата система усилва получения сигнал 3 пъти. Действителната сила на сърдечните съкращения беше изразявана в милинютони (mN) след трикратно редуциране на регистрираната усилена амплитуда. Получените стойности показваха абсолютната стойност на силата на сърдечните съкращения в момента на изследването. Осредняването на стойностите за силата на сърдечните съкращения във всяка експериментална група и сравняването между отделните групи по абсолютни стойности беше невъзможно поради индивидуалните характеристики на използваните животни. Ето защо силата на сърдечните съкращения беше представена като % от силата, измерена на 4^{-тата} минута от началото на експеримента, приета за 100%. При *in vitro* условията грубата интервенция от изолирането на сърцето беше еднократна и ефекта от нея бързо отшумяваше.

Опитите бяха провеждани на стайна температура (18-22 °C). Всички вещества бяха разтваряни в Рингеров разтвор и въвеждани в канюлата в краен обем от 200 µl. При контролните опити препаратите бяха третираны само с чист Рингеров разтвор

на интервали, съответстващи на въвеждането на останалите вещества в продължение на 75 min (фиг.11).

Всички данни са представени като средни стойности \pm стандартната грешка. Броят на опитите в текста е представен с *n* за всяка експериментална група. Статистическата достоверност беше определяна чрез Стюдънт t-тест за независими проби. За статистически достоверни бяха приети данни с $p < 0.05$.

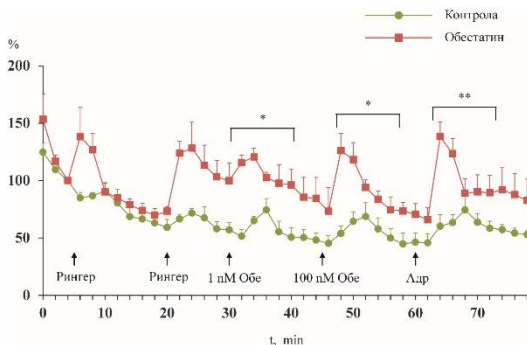
IV. РЕЗУЛТАТИ

Ефект на обестатин върху сърдечната дейност на жаба

При нашите експериментални условия препаратите от изолирани жабешки сърца при *in vitro* условия показват нормална съкратителна активност с относително стабилна амплитуда на сърдечните съкращения. Силата на спонтанните съкращения на изолираното сърце най-силно намаляват през първите няколко минути, след което понижението им е незначително в хода на експеримента. Поради тази причина обестатинът беше въвеждан 30 min след началото на опита, което осигурява време за адаптация и 15 минути за третиране с инхибиторите, прилагани *in vitro*.

Въведени бяха концентрации на обестатин от 1 и 100 nM през интервал от 15 min. Обестатинът показва нарастващ статистически достоверен положителен инотропен ефект върху сърдечната дейност на изолираното жабешко сърце и в двете приложени концентрации (фиг. 13).

Положителният инотропен ефект на обестатина се наблюдаваше в рамките на около 6 min. Най-ниската използвана от нас концентрация (1 nM) повишаваше амплитудата на сърдечните съкращения с 65% ($n=6$) 2 min след въвеждането на обестатина, с 56% 4 min след въвеждането и с 28% 6 min след третирането с обестатин. При концентрация от 100 nM повишаването беше с 72% на 2 min след въвеждането на обестатина и достигаше максимална стойност още на 4 min, но и по-бързо намаляваше в сравнение с по-ниската концентрация. Четири минути след третирането със 100 nM обестатин повишението беше с 54%, а след 6 min – с 25%.



Фигура 13. Ефект на обестатина върху силата на сърдечните съкращения на сърце от жаба. Ефектът на обестатин (■) в *in vitro* условия е сравнен с контролните амплитуди (●), при които въвеждането на обестатина беше заменено с въвеждане на същия обем Рингеров разтвор на съответната минута. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ спрямо контролната амплитуда в Рингеров разтвор. Данните са представени като средни стойности \pm стандартна грешка ($n=6$)

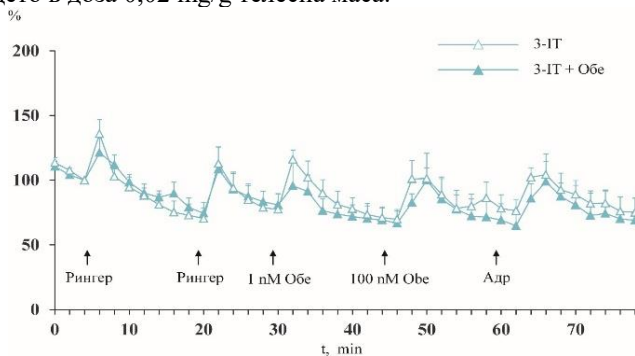
Ефект на обестатина върху сърдечната дейност на жаба след третиране с 3-IT

Положителният инотропен ефект на обестатина и получените по-рано данни, насочиха вниманието ни към изследване участието на вегетативните нервни окончания, запазени в стената на сърцето, при наблюдавания ефект. Поради тази причина бяха проведени серия от експерименти със специфично фармакологично елиминиране на адренергичната сигнализация.

Използван беше 3-IT, селективен инхибитор на тирозин хидроксилазата, която е скоростоопределящия ензим в катехоламинната биосинтеза. 3-IT е физиологична молекула, но в концентрации, по-високи от физиологичните ѝ серумни стойности, предизвиква смъртта на неврони, които експресират тирозин хидроксилаза, като допаминергични неврони на *substantia nigra* или норадренергични симпатикови окончания на вегетативната нервна система (Fernández-Espejo et. al. 2018). 3-IT се открива както в органи, където присъстват биохимичните пътища на неговата биосинтеза и разграждане – щитовидната жлеза (Ludgate et. al. 2011), а също така и в нетиреоидни структури като стомашно-чревния тракт, бъбреците и черния

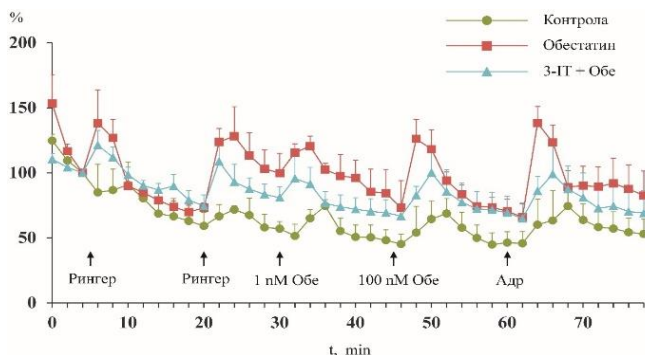
дроб (De La Vieja et. al. 2000, Lai et. al. 2006, Ludgate et. al. 2011). Серумните нива на 3-IT в жаби не са известни. Затова ние избрахме да го инжектирахме в концентрация (30 μM), която е около 40 пъти над физиологичните му нива в серум от човек ($0.69 \pm 0.20 \text{ nM}$) (Tan et. al. 1990).

Инхибиторът 3-IT беше инжектиран в гръбния лимфен сак на жабата един час преди изолирането и канюлирането на сърцето в доза $0,02 \text{ mg/g}$ телесна маса.



Фигура 14. Ефект на обестатина върху амплитудата на сърдечните съкращения на препарат „изолирано сърце“ след предварително инжектиране с $0,02 \text{ mg/g}$ телесна маса 3-IT: Амплитуда на сърдечните съкращения (\triangle) след предварително третиране с 3-IT е сравнена с тази в присъствие на обестатин (\blacktriangle) след предварително инжектиране на 3-IT. Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$).

При *in vivo* третиране с този инхибитор, първата концентрация на обестатин беше въведена 30 min след началото на експеримента. Този начин на прилагане на инхибитора осигурява нужното му време за действие и проява на ефекта му върху катехоламинната биосинтеза във венозните разширения на симпатиковите аксони. 3-IT в тази концентрация премахваше инотропния ефект на обестатина върху силата на сърдечните съкращения и в двете приложени концентрации - 1 и 100 nM (фиг.14). Той понижаваше силата на съкращенията и ги доближаваше до контролните стойности, което показваше продължителното му влияние върху количеството на секретирания катехоламини по време на целия експеримент.



Фигура 15. Сравнение ефекта на обестатина в отсъствие и присъствие на инхибитора 3-ИТ. Ефектът на обестатина след предварително инжектиране на 3-ИТ (▲) е сравнен с ефекта му (■) в *in vitro* условия. Контролните амплитуди на сърдечните съкращения (●) са показани за сравнение. Данните са представени като средни стойности ± стандартната грешка (n=6).

В присъствие на инхибитора 3-ИТ, обестатинът не показваше статистически достоверен положителен инотропен ефект, въпреки че силата на сърдечните съкращения беше повишена в сравнение с тази при контролни условия. Такова повишаване на силата на сърдечните съкращения бе наблюдавано и в контролните опити, третирани само с инхибитора. Последният резултат е в съответствие с литературните данни, че 3-ИТ увеличава скоростта на освобождаване и обратно захващане на калций в клетъчни култури от човешки кардиомиоцити, което предполага допълнителен ефект на 3-ИТ по катехоламин-независим механизъм чрез директно въздействие върху сърдечните мускулни клетки (Yang et. al. 2014).

Така 3-ИТ понижаваше положителния инотропен ефект на обестатина върху сърдечната дейност на жабата с 31%, 53% и 89% спрямо чистия ефект на пептида, съответно на 2-рата, 4-тата и 6-тата минута от въвеждането на обестатин в концентрация 1 pmol/l. Понижението на ефекта при концентрация 100 pmol/l беше 60%, 33% и 36% съответно на 2-рата, 4-тата и 6-тата минута от въвеждането на обестатина.

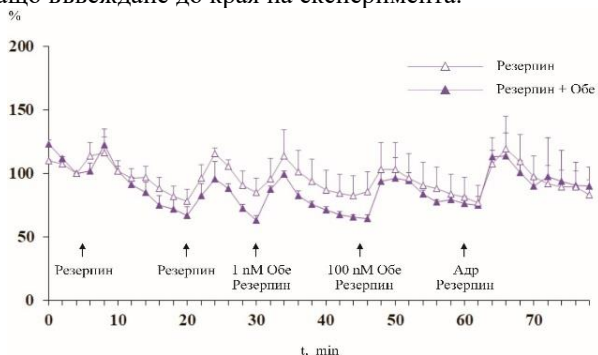
Ефект на обестатина върху сърдечната дейност на жаба в присъствие на резерпин

Участието на депонирането на адреналина във везикулите на вегетативните нервни окончания в положителния инотропен ефект на обестатина, беше изследвано с помощта на резерпин. Активният транспорт на катехоламините в синаптичните везикули за тяхната екзоцитоза се осъществява от везикуларните моноаминови транспортери VMAT1 и VMAT2 (Bernstein A. I. 2014). VMAT1 (SLC18A1) се експресира най-вече в периферията, в симпатиковата вегетативна нервна система, в надбъбречните хромафинни клетки и ендокринните клетки в червата. VMAT2 (SLC18A2) се експесира както в периферната (ентерална нервна система, надбъбречни хромафинни клетки, ендокринни клетки в стомаха и тромбоцити), така и в централната нервна система (всички моноаминергични неврони на мозъка) (Weihe et. al.1994).

Складирането във везикулите може да се възпрепятства от вещества като резерпин. Тези вещества намаляват амините в невроните чрез блокиране на тяхното включване във везикули. Те блокират и повторното включване на допамина във везикули след обратния му захват от синаптичната цепка. Допаминът в окончанието, който не е включен във везикула се деаминира от ензима моноаминоксидаза (MAO), който се намира в нервното окончание или е свързан към външната страна на мембраната на невроналните митохондрии (Webster 2001). Допаминът в терминалите на норадренергичните неврони се транспортира във везикули, където везикуларният ензим допамин- β -хидроксилаза, хидроксилира β -въглеродния атом и с това превръща допамина в норадреналин. Затова в неврони с блокирано депониране на допамина във везикули не се осъществява секреция на допамин и на неговите метаболити норадреналин и адреналин (Webster 2001). Резерпинът е необратим и неспецифичен инхибитор на VMAT1 и 2 (Liu et. al. 1992, Erickson et. al. 1996). Блокирайки трансфосфатазата, която поддържа протонния градиент, той постепенно изчерпва медиатора от невронните везикули (Webster 2001).

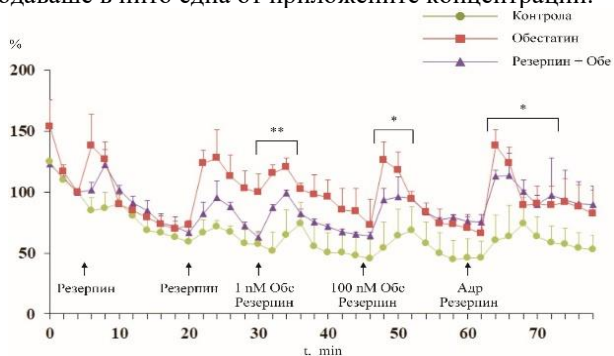
Резерпинът беше прилаган в концентрация 10 $\mu\text{mol/l}$. Той бе въвеждан в канюлата, заедно с Рингеровия разтвор 25

минути преди третирането с обестатин, както и при всяко следващо въвеждане до края на експеримента.



Фигура 16. Ефект на обестатина върху амплитудата на сърдечните съкращения в присъствие на резерпин: Ефектът на обестатина (▲) върху силата на сърдечните съкращения е сравнен с контролните амплитуди в присъствие на резерпин (△) в *in vitro* условия. Данните са представени като средни стойности \pm стандартна грешка ($n=6$)

Както е показано на фиг. 16, ефектът на обестатина беше напълно премахнат от резерпина, който дори понижаваше амплитудата на сърдечните съкращения под контролните стойности. Положителният инотропен ефект на обестатина не се наблюдаваше в нито една от приложените концентрации.



Фигура 17. Сравнение ефекта на обестатина в отсъствие и присъствие на инхибитора резерпин. Ефектът на обестатина в присъствие на $10 \mu\text{mol/l}$ резерпин (▲) е сравнен с ефекта му (■) в *in vitro* условия и спрямо контролните амплитуди (●). ** $p < 0.01$ и * $p < 0.05$

спрямо контролната амплитуда в Рингеров разтвор. Данните са представени като средни стойности \pm стандартна грешка ($n=6$).

Сравнен с чистия му ефект, обестатинът в присъствие на резерпин, не показваше статистически достоверен положителен инотропен ефект, въпреки че силата на сърдечните съкращения отново беше повишена в сравнение с тази на контролата (фиг.17). Комбинацията от обестатин с резерпин статистически достоверно повишава силата на сърдечните съкращения спрямо контролните амплитуди. Това повишение на силата на сърдечните съкращения се наблюдаваше и в контролните експерименти, които са третираны само с инхибитора. Това би могло да се дължи на предизвиканото от резерпина покачване на цитозолната концентрация на адреналин и повишеното му свързване с транспортера за обратно захващане, но откъм цитоплазмената му страна (Webster 2001). В такъв случай посоката на неговия транспорт е извън клетката, а не обратното (обратен захват), което активира постсинаптичните адренорецептори и така предизвиква наблюдаваната от нас повишена сила на сърдечните съкращения. Тази форма на медиаторно освобождаване се нарича ретротранспорт и се извършва независимо от възбуждането на неврона или от вътреклетъчната калциева концентрация (Webster 2001).

Резерпинът понижаваше инотропния ефект на обестатина с 45%, 39% и 71% спрямо чистия ефект на пептида, съответно на 2-рата, 4-тата и 6-тата минута от въвеждането на обестатин в концентрация 1 nM. Понижението на ефекта при концентрация 100 nM беше 44%, 41% и 4% съответно на 2-рата, 4-тата и 6-тата минута от въвеждането.

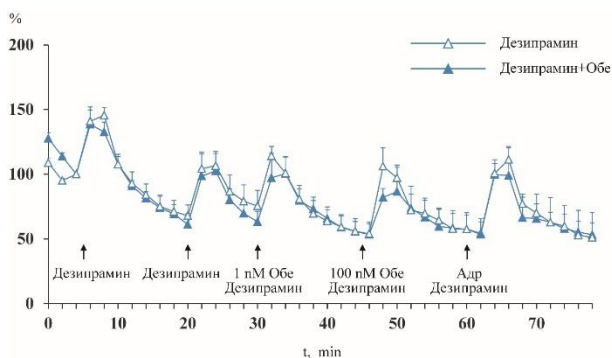
Добавеният в края на експеримента адреналин в концентрация 50 $\mu\text{mol/l}$, водеше до краткотрайно, но статистически достоверно покачване силата на сърдечните съкращения спрямо контролните стойности (фиг. 17).

Ефект на обестатина върху сърдечната дейност на жаба в присъствие на дезипрамин

Значението на механизма за обратния транспорт на освободения в синаптичното пространство медиатор за обестатиновия ефект беше изследвано с дезипрамин. Транспортерът, контролиращ синаптичната концентрация на катехоламините е белтък, който ги транспортира обратно чрез

механизъм за обратно захващане в пресинаптичните мембрани на съответните неврони (Webster 2001). Транспортът на норадреналин се осъществява чрез ко-транспорт на Cl^- и Na^+ . Свързването на Na^+ и норадреналин към преносителя от неговата екстрацелуларна страна, води до конформационни промени, които отварят вътрешен канал в преносителя. Това позволява преминаването на норадреналин от екстрацелуларното пространство в цитозола на неврона (Webster 2001). Много вътреклетъчни посредници могат да модифицират субстратния афинитет на преносителя чрез фосфорилиране или гликозилиране и така да повлияват неговата функция (Bönisch et. al. 1998).

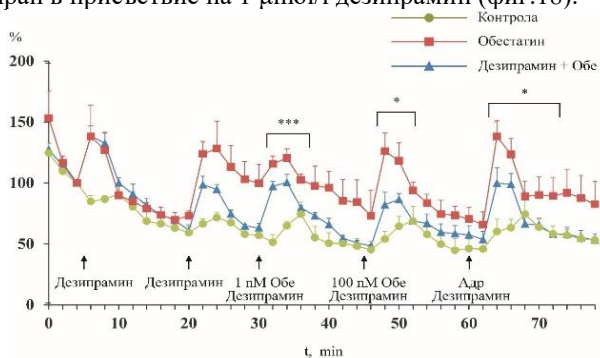
Трицикличният антидепресант дезипрамин е селективен инхибитор на норадреналиновия преносител, отговорен за невроналното поглъщане на норадреналин (Zhou et. al. 2004, Zhu et. al. 2002). В жабешкото сърце адреналинът, а не норадреналинът е симпатиковия медиатор (Angelakos et. al. 1965). Установено е, че дезипраминът се свързва със същия афинитет и към адреналиновия транспортер, което блокира обратното поемане (връщането) на адреналина (Pimoule et. al. 1987). Той беше въвеждан в концентрация $1 \mu\text{mol/l}$ в канюлата по същия начин, както беше описано при изследванията с резерпин.



Фигура 18. Ефект на обестатина върху амплитудата на сърдечните съкращения в присъствие на дезипрамин: Ефектът на обестатина (\blacktriangle) върху силата на сърдечните съкращения е сравнен с контролните стойности в присъствие на дезипрамин (\triangle) *in vitro*

условия. Данните са представени като средни стойности \pm стандартна грешка ($n=6$)

В присъствие на дезипрамин силата на сърдечните съкращения остава съизмерима с тази при контролни условия. Положителният инотропен ефект на обестатина и в двете прилагани концентрации (1 nM и 100 nM) беше напълно блокиран в присъствие на 1 $\mu\text{mol/l}$ дезипрамин (фиг.18).



Фигура 19. Сравнение ефекта на обестатина в отсъствие и присъствие на инхибитора дезипрамин. Ефектът на обестатина в присъствие на 1 $\mu\text{mol/l}$ дезипрамин (\blacktriangle) е сравнен с ефекта му (\blacksquare) в *in vitro* условия. Контролните амплитуди (\bullet) са дадени за сравнение. * $p < 0.001$ и * $p < 0.05$ спрямо контролната амплитуда в Рингеров разтвор. Данните са представени като средни стойности \pm стандартна грешка ($n=6$).**

Сравнен спрямо чистия му ефект, обестатинът в присъствие на дезипрамин, показваше по-слаб, но статистически достоверен положителен инотропен ефект спрямо контролните амплитуди (фиг.19). Дезипраминът понижаваше инотропния ефект на обестатина с 29%, 36% и 78% спрямо чистия ефект на пептида, съответно на 2-рата, 4-тата и 6-тата минута от въвеждането на обестатин в концентрация 1 nM. Понижението на ефекта при концентрация 100 nM беше 61%, 57% и 80% съответно на 2-рата, 4-тата и 6-тата минута от въвеждането (фиг.19). Сумарният ефект на обестатина и дезипрамина показваше статистически достоверен инотропен ефект спрямо контролните стойности. Тези резултати най-вероятно се дължат на предизвиканото от дезипрамина удължено действие на адреналина в синапса, което се вижда и от контролните изследвания с дезипрамин (фиг. 18, \triangle).

Екзогенно добавеният адреналин и тук повишава статистически достоверно амплитудата на сърдечните съкращения спрямо контролните, при които на съответното въвеждане е добавен Рингеров разтвор (фиг. 19).

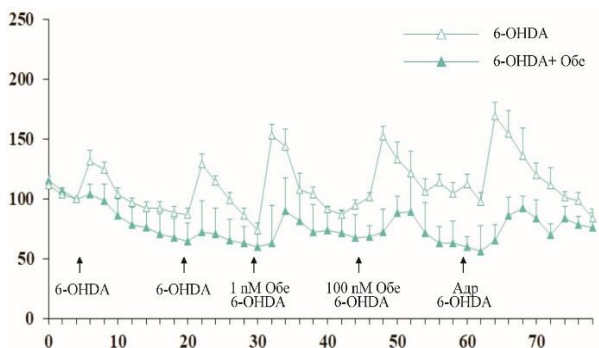
Ефект на обестатина върху сърдечната дейност на жаба в присъствие на невротоксина 6-OHDA

Положителния инотропен ефект на обестатина беше проверен и след фармакологично елиминиране на симпатиковите окончания, запазени в миокардния слой, състоящ се от мускулни клетки подредени в снопчета.

Затова бе използван токсичният за невроните 6-OHDA. Той е невротоксин, който навлиза като „фалшив медиатор“ чрез катехоламинната система за обратен захват в катехоламинергичните неврони. В рамките на минути той се окислява до няколко цитотоксични субстанции като генерира свободни радикали и разрушава допаминергичните неврони чрез оксидативен стрес и последваща апоптоза. Освен това, 6-OHDA причинява хиперполяризация на митохондриалната мембрана, което потиска комплексите на дихателната верига на митохондриите (Endepols et. al. 2004).

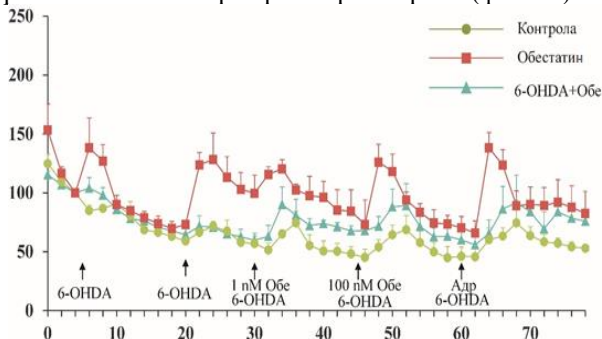
С 6-OHDA бяха проведени две серии от опити. В едната той беше въвеждан в канюлата *in vitro*, а в другата беше инжектиран в гръбния лимфен сак един час преди изолирането и канюлирането на сърцето. 6-OHDA беше разтворен непосредствено преди инжектиране. За предотвратяване на окислението му, бе добавяна и 0,2 mg/ml аскорбинова киселина като антиоксидант.

При първата серия от опити 6-OHDA в концентрация 10 mmol/l с добавен антиоксидант, беше въвеждан в канюлата на изолираното сърце 25 минути преди прилагането на най-ниската концентрация на обестатина (фиг. 20).



Фигура 20. Ефект на обестатина в присъствие на 6-ОНДА (10 $\mu\text{mol/l}$) върху силата на сърдечните съкращения на сърце от жаба *in vitro* условия. Ефектът на обестатин (\blacktriangle) върху сърдечните съкращения е сравнен с контролните амплитуди след *in vitro* прилагане на 6-ОНДА (\triangle). Данните са представени като средни стойности \pm стандартна грешка ($n=6$).

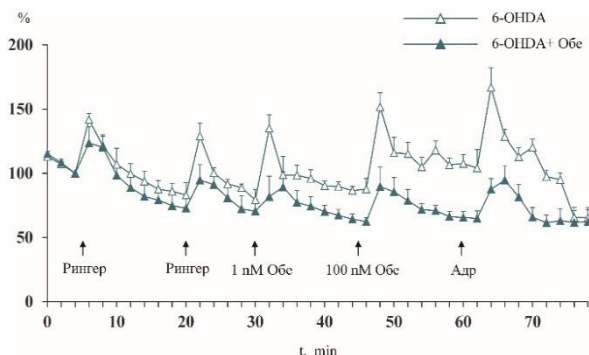
В присъствие на невротоксина 6-ОНДА, обестатинът не показваше положителен инотропен ефект. И при двете приложени концентрации на обестатина, силата на сърдечните съкращения беше под контролните стойности (фиг. 20) и само незначително нарастваха спрямо третираните на същите интервали с чист Рингеров разтвор контроли (фиг. 21).



Фигура 21. Ефект на екзогенно добавения адреналин върху амплитудата на сърдечните съкращения на препарат „изолирано сърце“ от жаба в присъствие на невротоксина 6-ОНДА. Ефектът на адреналина в присъствие на 10 $\mu\text{mol/l}$ 6-ОНДА (\blacktriangle) е сравнен с ефекта му след въвеждане на обестатин (\blacksquare) *in vitro* условия и този в

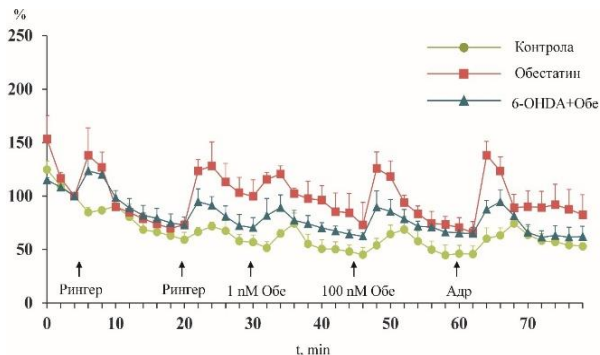
контролните амплитуди (●). Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$).

За да се осигури достатъчно време за действие върху адренергичните окончания, проведехме и серия от опити, в които разтвор с 6-OHDA (40 $\mu\text{g/g}$ телесна маса) беше инжектиран в гръбния лимфен сак на жабата един час преди началото на експеримента. На 30-та минута от началото на *in vitro* експеримента обестатинът бе въвеждан последователно, в двете концентрации.



Фигура 22. Ефект на обестатина върху амплитудата на сърдечните съкращения на препарат „изолирано сърце“ след предварително инжектиране с 40 $\mu\text{g/g}$ 6-OHDA: Амплитуда на сърдечните съкращения (Δ) след предварително третиране с 6-OHDA е сравнена с тази в присъствие на обестатин (\blacktriangle) след предварително инжектиране с 6-OHDA. Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$).

И в тази серия от опити, обестатинът не показваше положителен инотропен ефект. Тук също силата на сърдечните съкращения и в двете приложени концентрации на обестатина, беше по-ниска от контролните стойности (фиг. 22) и незначително повишена в сравнение с тази на контролите, третираны на с чист Рингеров разтвор (фиг. 23).



Фигура 23. Ефект на адренергичната медиация върху амплитудата на сърдечните съкращения на препарат „изолирано сърце“ след предварително инжектиране на 40 $\mu\text{g/g}$ 6-OHDA. Ефектът на адреналина след инжектиране на 6-OHDA (\blacktriangle) е сравнен с ефекта му след въвеждане на обестатин (\blacksquare) в *in vitro* условия и този при контролни условия (\bullet). Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$).

Както се вижда от фигури 20 и 22, амплитудите на контролните сърдечни съкращения, както при *in vitro* въвеждания, така и при предварително инжектирания 6-OHDA силно надвишават тези в присъствие на обестатин. Освен това повишенията, наблюдавани винаги при прилагането на разтворите, при въвеждането на 6-OHDA бяха особено изразени, а в присъствие на обестатина значително редуцирани. Това предполага собствен, неспецифичен ефект на 6-OHDA върху сърцевите клетки, който се премахва в присъствие на обестатина.

Обобщените данни за промяната в амплитудата на сърдечните съкращения вследствие на екзогенно добавения адреналин в края на всеки експеримент след третиране с обестатин и инхибиторите в сравнение с контролата са представени в табл. 3.

Таблица 3

Обобщени данни за промените в амплитудата след добавяне на адреналин в края на всеки експеримент. Данните се отнасят за разлика между контролните стойности и тези при съответните групи експерименти, а * показва статистическата достоверност ($p < 0,001$ - ***, $p < 0,01$ - **, $p < 0,05$ - *)

Екзогенно добавен адреналин

	2-ра мин	4-та мин	6-та мин
Обестатин (Фиг. 13)	78% (**)	60% (**)	15% (**)
Обе + 3-IT (фиг. 15)	26%	36%	13%
Обе+Резерпин (фиг. 17)	53% (*)	50% (*)	26% (*)
Обе+Дезипрамин (фиг. 19)	40% (*)	36% (*)	-11%
Обе+6-ОНДА (<i>in vitro</i>) (фиг. 21)	6%	23%	18%
Обе+6-ОНДА (предварително инж.) (фиг. 23)	28%	32%	8%

Добавеният в края на всеки експеримент екзогенен адреналин предизвиква силно, но краткотрайно (за около 4 минути) повишаване на силата на сърдечните съкращения, спрямо контролите при които на съответното въвеждане е добавен само Рингеров разтвор. От таблица 3 се вижда, че повишението в съответните минути след въвеждането на адреналина е най-значимо в експериментите с обестатин и по-слабо в експериментите с добавен инхибитор. Силата на сърдечните съкращения в следствие на добавения обестатин се запазва висока и до края на експеримента не спада до контролните амплитуди (фиг.13), което предполага продължителна стимулация на β_1 -адренорецепторите. Тази стимулация е предизвикана индиректно, първоначално от двукратно добавения обестатин и накрая от самия адреналин в края на експеримента. Тъй като в присъствието на инхибитори ефектът на обестатина е потиснат, в края на тези експерименти се вижда повишаването на силата на сърдечните съкращения предизвикани непосредствено от добавения адреналин, без натрупване на ефекта му върху β_1 -адренорецепторите. Установено е, че катехоламин-зависимо активираните β_1 -адренорецептори, продължително стимулират синтезата на вторични посредници (цАМФ) в първични кардиомиоцити и неврони (Fu et. al. 2014). Това показва, че физиологичният ефект на адреналина в изследвания обект може да продължат след отстраняване му от синаптичното пространство поради активността на вътреклетъчните реакции, предизвикали

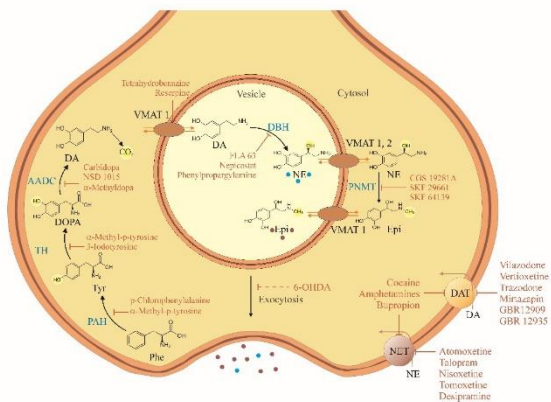
синтезата на този втори посредник и на стимулираните от него процеси.

V. ОБСЪЖДАНЕ

Получените от нас резултати показват, че обестатинът има силен положителен инотропен ефект (фиг. 13). От данните до момента, става ясно, че този ефект се реализира чрез активиране на адренергичните рецептори и то главно на β -адренорецепторите. Това се потвърждава от данни, при които ефектът на обестатина е бил частично блокиран от празозин (селективен блокер на α_1 -рецептори) и напълно – от пропранолол (блокер на β -адренорецептори) (Sazdova et. al. 2009). В същото време прилагането на инхибитори, които не са част от вътреклетъчната сигнална верига на адренорецепторите също премахват неговия ефект (Sazdova et. al. 2009). Това предполага, че кардиомиоцитите не са прицелната тъкан за ефекта на обестатина.

Другата потенциална тъкан чрез която би могъл да се реализира ефекта на обестатина са нервните окончания. Те могат да бъдат стимулирани да отделят медиатор, който да оказва инотропния ефект върху сърцето. Получените до момента данни показват, че изследваният пептид има силен дозозависим ефект. Той е най-изразен при последните две концентрации (100 и 1000 nM, които са прилагани през последните 30 минути от експеримента (Sazdova et. al. 2009). Това би било възможно само ако в запазените в стената на сърцето синапатикови окончания се осъществява синтеза на нови молекули медиатор.

Получените от нас резултати показват, че инхибирането на тирозин хидроксилазата, ключовият ензим от синтезния път на катехоламините, потиска напълно ефекта на обестатина (фиг. 14). Допаминът, норадреналинът и адреналинът съдържат катехолов пръстен (6-въглероден пръстен с две съседни хидроксилни групи) и аминок група, заради това тези амини се наричат катехоламини. В зависимост от наличните ензими в окончанието, може да бъде освободен всеки един от тези катехоламини. Първите две стъпала от тяхната синтеза са общи за всички катехоламини. Синтетичният им път започва от аминокиселината тирозин (фиг.24).



Фигура 24. Биосинтеза на катехоламини: AADC – ароматна L-амино киселинна декарбоксилаза; DA – допамин; DAT – допаминов транспортер; DBH – допамин-β-хидроксилаза; DOPA – L-3,4-дихидроксифенилаланин; Epi – епинефрин (адреналин); NE – норадреналин; NET – норадреналинов транспортер; PAH – фенилаланин-4-хидроксилаза; Phe – фенилаланин; PNMT – фенилетианоламин N-метилтрансфераза; TH – тирозин-3-хидроксилаза; Tyr – тирозин; VMAT – везикуларен моноаминов транспортер.

В аксоналните окончания под действие на цитозолния ензим тирозин хидроксилаза, тирозинът се превръща в L-допа. Това е скоростно-лимитиращата реакция в синтеза, изискваща присъствие на молекулен кислород и Fe^{2+} , както и тетрахидробиоптерин (BH_4) (Smith 2002).

Като ключово контролно звено в синтеза на катехоламини, тирозин хидроксилазата е обект на различни регулаторни механизми. Ензимът има многодоменна структура, с регулаторен домен (R) с размер от 100-150 аминокиселинни остатъка в N-края, последван от каталитичен домен (C) от около 330 остатъка и домен при C-края на около 20 аминокиселини. Домен R участва в регулиране на активността на ензима. Начините на регулиране включват фосфорилиране от множество кинази при 4 различни серинови остатъка и дефосфорилиране от 2 фосфатази. Ензимът се инхибира чрез отрицателна обратна връзка от крайните продукти на синтеза – катехоламините (Daubner et. al. 2011).

Допаминът, норадреналинът и адреналинът потискат активността на тирозин хидроксилазата по пътя на отрицателната обратна връзка. Те се свързват в активното място на ензима, което се припокрива с тетрахидробиоптерин и в резултат на това се променя конформацията на R-домена, което предотвратява навлизането на нови молекули субстрат в активния център на ензима (Daubner et. al. 2011). Катехоламините, свързани към тирозин хидроксилазата намаляват нейната активност с около 15% (Gordon et. al. 2008). Те се освобождават от активния център ако ензима бъде фосфорилиран. Фосфорилирането на тирозин хидроксилазата от ПК А на Ser40 намалява афинитета ѝ към катехоламините около 300 пъти (Ramsey & Fitzpatrick 1998). Счита се, че има и второ място с по-нисък афинитет на свързване на катехоламините към тирозин хидроксилазата, което води до допълнително 10-кратно понижаване на активността ѝ. То не се инхибира от фосфорилиране при Ser40, а свързването и отделянето от тирозин хидроксилазата става според концентрацията на катехоламините (Dickson & Briggs 2013). Това предполага, че това място на свързване има способността да променя активността на тирозин хидроксилазата в отговор на променящите се концентрации на катехоламините в цитозола. Това място може да бъде основният контролен механизъм при базални или тонични условия на активиране на катехоламинергичните неврони. В условия на висока активност на тези неврони мястото с нисък афинитет както при нефосфорилираната, така и при фосфорилираната тирозин хидроксилаза би било наситено и фосфорилирането на ензима би било основният механизъм за регулиране на активността на тирозин хидроксилазата. Сложността на регулирането на тирозин хидроксилазата чрез инхибиране на обратната връзка и фосфорилиране може да отразява различните изисквания към синтеза на катехоламини в различните тъкани и при различни състояния. Освен това, фосфорилирането на Ser19 и Ser31 може да увеличи скоростта на фосфорилиране на Ser40, като Ser19 увеличава скоростта около три пъти, а Ser31 увеличава скоростта около девет пъти (Lehmann et. al. 2006, Toska et. al. 2002). Това усилване на фосфорилирането не се наблюдава при катехоламин-свързания ензим, а само при свободната от катехоламини тирозин хидроксилаза. Това предполага, че така

описаното йерархично фосфорилиране не играе роля при първоначалното активиране на тирозин хидроксилазата, но служи за поддържане на активността ѝ на по-високо ниво след фазата на активиране. Показано е, че фосфорилирането на Ser19 и Ser31 засилва активирането на тирозин хидроксилазата *in situ* (Lehmann et. al. 2006).

В съответствие с горепосочените литературни данни получените по-рано резултати показват, че обестатинът повлиява неврона, активирайки както ПК А, така и ERK1/2 (Sazdova et. al. 2009), което осигурява многостепенно фосфорилиране на тирозин хидроксилазата. Това довежда до засилване на катехоламинната синтеза и до освобождаване на адреналин от симпатиковите нервни окончания и до наблюдавания положителен инотропен ефект на обестатина. Използваният 3-IT инхибитор на тирозин хидроксилазата (фиг.14) напълно премахва ефекта на обестатина като не позволява синтезата на адреналин, който медира този ефект.

Другата потенциално важна стъпка в синтезата на катехоламините и респективно за ефекта на обестатина е транспортването на допамин във везикулите. Допаминът в окончанието, който не е включен във везикула се разгражда от MAO, което намалява количеството на отделяните катехоламини от окончанието (Webster 2001). Освен това много проучвания както *in vitro*, така в животински модели показват, че нерегулираните цитоплазмни нива на допамин са невротоксични (Hastings et. al. 1996, Asanuma et. al. 2003). *In vitro* експерименти сочат, че уязвимостта на допамините неврони при болест на Паркинсон, може да се дължи на цитозолния допамин (Mosharov et. al. 2009). Също така в недопаминергични неврони на мишки, в които се експресира допаминен транспортер (DAT), но са с намалено съдържание на VMAT2, обратното захващане на допамин се осъществява, но той не се складира във везикули. Това довежда до двигателни дефицити и тежка невродегенерация, натрупване на α -синуклеин, придружено от маркери за повишено допаминово окисление (Bernstein et. al. 2014).

Норадреналинът, подобно на допамин, се складира в големи везикули, натрупващи се във варикозните разширения (Smith 2002). Тези везикули съдържат АТФ, белтъци и двувалентни метални катиони. Концентрацията на

норадреналина във везикулите се смята, че е в диапазона от 0,1 – 0,2 М, което означава, че тя превишава концентрацията му в цитозола от 10 000 до 100 000 пъти. Тази концентрационна разлика движи норадреналина навън към цитоплазмата. Везикуларното натрупване на норадреналин е възможно благодарение на вторично активен транспорт чрез везикуларен моноаминов транспортер (VMAT). Везикуларните моноаминови транспортери са от съществено значение за правилна моноаминергична невротрансмисия, която изисква складиране на медиатора в синаптичните везикули чрез VMAT за последваща Ca^{2+} -стимулирана екзоцитоза (Sudhof 2004). Основната функция на тези транспортери е да натрупат достатъчно количество от медиатора, което да е готово за освобождаване при сигнал. Също така предпазват неврона от потенциално токсичните ефекти от излишъка на цитоплазмен норадреналин и поддържат концентрационен градиент, улесняващ норадреналиновия обратен захват от синапса (Webster 2001). Навлизането на норадреналина във везикулата зависи от електрохимичния градиент, създаден от излишъка на протони от вътрешната страна на везикуларната мембрана. Този градиент се поддържа от АТФ-зависима везикуларна протонна АТФаза. Преносът на една молекула норадреналин във везикулата чрез транспортера се съпровожда от излизане на два H^+ йона (Parsons 2000). Счита се, че свързването или прехвърлянето на първия H^+ йон увеличава афинитета на транспортера за норадреналин, а свързването на втория H^+ йон задейства прехвърлянето на медиатора (Webster 2001).

Получените от нас резултати показват, че инхибирането на VMAT от резерпин (фиг. 16) премахва положителния инотропен ефект на обестатина върху кардиомиоцитите. Резултатите до момента ни карат да смятаме, че обестатинът активира биосинтезата на катехолемини (в случая на адреналин) в нервното окончание чрез фосфорилиране на тирозин хидроксилазата. Блокирането на навлизането на образувалия се допамин във везикулите, увеличава неговата цитозолна концентрация. Адреналинът, навлязал в окончанието в резултат на обратен захват от синапса също се натрупва в цитозола. При стимулиране на невроните се увеличава отделянето на катехоламини, но се повишава и техния обратен захват от синапса. Въпреки че част от този медиатор се метаболизира от

МАО, а друга част преминава във везикулите, в цитозола се наблюдава преходно покачване на концентрацията му, което води до по-интензивно субстратно инхибиране на тирозин хидроксилазата (Webster 2001). В случая когато VMAT е инхибиран, адреналинът от обратния захват също се натрупва в цитозола и концентрацията му там се увеличава. Повишените нива на крайните продукти от биосинтезата на катехоламините довежда до засилване на инхибирането на тирозин хидроксилазата и до липсата на ефект на обестатина, наблюдаван от нас в присъствие на резерпин.

Освободените в синаптичното пространство катехоламини се транспортират обратно в неврона чрез механизъм за обратно захващане по пресинаптичните мембрани на съответните неврони. Транспортърът, контролиращ синаптичната им концентрация, е белтък с 619 аминокиселини с 12 хидрофобни мембраносвързани домена и N- и C-край към цитоплазмената страна (Webster 2001). Норадреналиновият транспортер (NET) се намира в пресинаптичната плазмена мембрана на норадренергичните неврони, където поема синаптично освободения норадреналин. Следователно NET служи като основен механизъм за инактивиране на норадренергичната сигнализация (Zhou 2004). Идентифициран е само един NET белтък, което предполага, че всяка промяна в неговата експресия може значително да промени норадреналиновата невротрансмисия (Zhu et. al. 2002). Транспортът на норадреналин се осъществява чрез ко-транспорт на Cl⁻ и Na⁺, затова преносителя се причислява към семейството на Cl⁻/Na⁺ преносители. Свързването на Na⁺ и норадреналин към транспортера от неговата екстрацелуларна страна, индуцира конформационни промени, които отварят вътрешен канал „врата“ в преносителя. Това позволява преминаване на норадреналин от екстрацелуларното пространство в цитозола на неврона (Webster 2001). Този механизъм на обратен захват се означава като невронален захват 1 (поглъщане 1) (Zhou 2004). В централната нервна система инхибирането на NET значително намалява симпатиковата активност, вероятно чрез α_2 -адренорецептор-медиран механизми (Schroeder & Jordan 2011). В глиалните клетки и периферията има и втори механизъм, означен като екстраневронален захват 2 (Webster 2001), при който освободения норадреналин се поема от други тъкани.

Значителна, макар и по-малка част от норадреналина, поет чрез системата „поглъщане 2“ се метаболизира от катехол-О-метилтрансфераза. В сърце на плъх, например, в резултат на този процес се транспортира норадреналин и други катехоламини в клетките на сърдечния мускул (Farnebo & Malmfors 1969). Транспортърът на органични катиони 3 (OCT3) е идентифициран като преносител, медиращ екстраневроналното поглъщане на норадреналин (Schroeder & Jordan 2011).

Механизмът на обратно захващане при бозайници е най-ефективен за норадреналин, докато поглъщането в миокарда на жабата показва предпочитание към адреналина след блокиране на този механизъм от кокаин (Stene-Larsen et. al. 1978). Обратно, механизмът за екстраневронално поглъщане има най-висок афинитет към преобладаващия катехоламин в надбъбречните жлези – адреналин при бозайници (Holzbauer & Sharman 1972) и норадреналин при земноводни (Stene-Larsen et. al. 1978).

Вещества като дезипрамин блокират транспорта на норадреналин през NET и довеждат до повишаване на синаптичната концентрация на медиатора (Zhou 2004). Това активира пресинаптични α_2 -адренорецептори, които се куплират с Gi белтък, който намалява нивото на цАМФ. Това води до намаляване освобожаването на норадреналин от пресинаптичното окончание (Webster 2001). Освен това намаляването на вътреклетъчната концентрация на цАМФ индиректно намалява навлизането на калциеви йони в окончанието и увеличава K^+ проводимост, което намалява възбудимостта на неврона (Starke 1987). Тези пресинаптични авторецептори играят важна роля в осигуряване на достатъчно количество медиатор за запазване на депата и предотвратяват прекомерната стимулация на постсинаптичните клетки (Webster 2001). В присъствие на дезипрамин положителния инотропен ефект на обестатина е напълно потиснат (фиг. 18) вероятно поради невъзможност за възстановяване на депата след първоначалната невромедиация.

Освен това процесът на невронално поглъщане има значение за навлизането и последващото задържане на амини, свързани с норадреналин, като „фалшиви медиатори“ в адренергичните неврони (Kopin 1968, Thoenen 1969). Едно от тези съединения е 6-OHDA. Той се натрупва в адренергичните

неврони, както в периферията, така и в ЦНС, но има свойството да причинява клетъчно увреждане, водещо до пълна дегенерация на адренергичните нервни окончания (Iversen 1971).

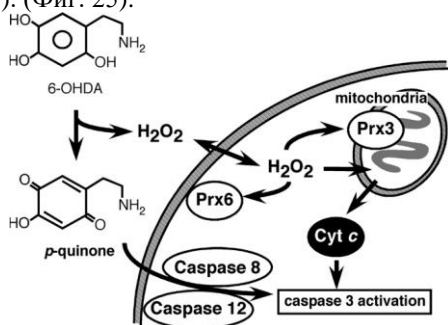
Клетъчната смърт, индуцирана от 6-OHDA, се предизвиква от реактивни кислородни видове (ROS), получени от автоокислението на 6-OHDA, както и в резултат на директен ефект върху митохондриалната дихателна верига (Rodriguez-Pallares et. al. 2007). Смята се, че молекулярният механизъм в основата на невротоксичността на 6-OHDA е формирането на ROS (Soto-Otero et. al. 2000). Също така е установено, че 6-OHDA действа като инхибитор на НАДН-дехидрогеназния комплекс (комплекс I) на митохондриалната дихателна верига (Glinka et. al. 1996, 1997). Смята се, че двата механизма са биохимично независими, но *in vivo* действат синергично (Glinka et. al. 1997). Проучванията сочат, че освен посочените механизми, се извършва и извънклетъчно генериране на ROS чрез автоокисление на 6-OHDA. То също играе важна роля в смъртта на допаминови неврони в ЦНС (Hanrott et. al. 2006) и е в основата на патогенезата на болестта на Паркинсон (Block & Hong 2005; Hald & Lotharius 2005).

6-OHDA се окислява до парахинон, който от своя страна произвежда индолин и индолови производни, които могат да образуват ковалентни връзки с нуклеофилни групи от макромолекули (Siggins & Forman 1973). Освен *p*-хинон в резултат на окислителното превръщане на 6-OHDA се освобождава и водороден пероксид *in vitro* (Heikkila & Cohen 1971) и *in vivo* (Heikkila & Cohen 1972), който също е отговорен за токсичността на 6-OHDA. В невроподобни катехоламинергични клетъчни култури – адреналната феохромцитомна клетъчна линия PC12 е установено, че клетъчната жизнеспособност значително намалява от 6-OHDA в концентрация по-голяма от 12,5 μM . Освен това е установено, че от 100 μM 6-OHDA се освобождава 50 μM водороден пероксид и 103 μM *p*-хинон (Saito et. al. 2007).

Формирането на ROS причинява оксидативен стрес, който довежда до апоптоза в нервни и други видове клетки (Maritim et. al. 2003). В допълнение към оксидативния стрес, 6-OHDA индуцира и стрес отговор на ендоплазмения ретикулум (Ryu et. al. 2002; Holtz & O'Malley 2003), който се смята че участва в патофизиологията на Паркинсоновата болест. Като

ендогенно депо за калциевы йони, ендоплазменият ретикулум е жизнено важен за вътреклетъчната калциева регулация. Калциевото съдържание в лумена на ендоплазмения ретикулум и в цитозола е много важно за митохондриалната функция и жизнеността на клетката (Michel et. al. 2013). 6-OHDA значително повишава цитозолната концентрация на калциевы йони в допаминовы неврони (Qu et. al. 2014). Счита се, че рианодиновият калциев канал в ендоплазмения ретикулум играе важна роля в това 6-OHDA-индуцирано нарушение на калциевата хомеостаза (Huang et. al. 2017). В PC12 клетъчни култури, 6-OHDA води до повишаване на вътреклетъчните нива на цАМФ и Ca^{2+} чрез L-тип Ca^{2+} канали и активиране на сигналната верига $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CaMKII} \rightarrow$ аденилатциклаза \rightarrow цАМФ. Така получените високи нива на цАМФ водят до процес на клетъчна смърт (Jin et. al. 2010; Park et. al. 2013). В опит да се установят кои апоптични пътища се активират, няколко проучвания са посочили участието на митохондриалната каспазна каскада в 6-OHDA-индуцираната апоптоза. 6-OHDA индуцира каспаза 3-зависимо разцепване на проапоптичната протеин киназа Сδ (ПКСδ) (Hanrott et. al. 2006). Мястото на разцепването от каспаза 3 е между регулаторния и каталитичния домен, което води до активиране на последния (Ghayur et. al. 1996). ПК С е окислително-чувствителна киназа и се активира в отговор на окислителен стрес (Kaul et. al. 2005) и изглежда е ключов медиатор в 6-OHDA-индуцираната клетъчна смърт (Hanrott et. al. 2006). Доказано е в PC12 клетки, че митохондриалната дисфункция, инициирана от 6-OHDA, индуцира освобождаването на цитохром с, което предизвиква последващо активиране на каспаза-9 с образуване на апоптозома в присъствието на АТФ и активира каспаза-3 (Hanrott et. al. 2006, Chen et. al. 2006). Активирането на каспаза 3 става 6 часа след прилагането на 6-OHDA (Saito et. al. 2007). Освобождаването на цитохром с от митохондриите в цитозола е необходимо за сглобяването на апоптозомата и следователно за активиране на каспазната каскада във вътрешния път на апоптоза (Wang 2001). Цитохром с може да бъде засечен 30 мин след излагане на 6-OHDA (Saito et. al. 2007). В същото проучване е установено, че водороден пероксид, генериран от 6-OHDA, индуцира окисляване на пероксиредуксин, освобождаване на цитохром с и активиране на каспаза. Смята се, че окисляването на

пероксиередуксина (водороден пероксид-редуциращ ензим) е един от маркерите за стрес, показващи оксидативните последици, предизвикани от оксидативния стрес. Установено е, че такова окисление на пероксиередуксина се случва 15 мин след излагане на 50 μM водороден пероксид (Saito et. al. 2007). Генерираните при това вторични продукти, включително р-хинон, участват в активирането на каспаза-3 по цитохром с-независим път (Saito et. al. 2007). Освен това има доказателства, които показват, че извънклетъчното автоокисление, което се осъществява чрез генериране на водороден пероксид и р-хинон, също играе важна роля в 6-OHDA-индуцираната цитотоксичност (Saito et. al. 2007). (Фиг. 25).



Фигура 25. Пътища за 6-OHDA-индуцирана PC12 клетъчна смърт (Saito et. al. 2007). 6-OHDA-индуцирана PC12 клетъчна смърт чрез H₂O₂-зависим и -независим механизъм на действие. Добавеният 6-OHDA бързо се окислява и генерира както H₂O₂, така и р-хинон. Генерираният H₂O₂ индуцира окисляване на Prx, освобождаване на цитохром с и активиране на каспаза-3. От друга страна, генерираният р-хинон може да индуцира активиране на каспаза-3 чрез активиране на каспаза-8 и каспаза-12 по независим от митохондриите начин.

С оглед на горепосочените литературни данни, ние направихме две серии от експерименти. В едната 6-OHDA беше въвежда като останалите инхибитори *in vitro* 25 мин преди обестатина. С оглед на това да се осигури повече време за продългосрочните му цитотоксични ефекти, проведохме и серия експерименти, при които той беше инжектиран в експерименталните животни един час преди началото на експеримента. В съответствие с посочените вече данни за симпатектомията, получените от нас резултати показват, че и в

двете серии експерименти в резултат на приложения 6-OHDA, обестатинът не проявява своя ефект (фиг. 20 и 22). Това потвърждава предположението, че инотропният ефект на обестатина се осъществява чрез нервните окончания. Получените резултати ни дават основание да смятаме, че обестатинът активира неизвестен Gs-куплиран рецептор в мембраната на нервните окончания и води до последващо активиране на МАПК-път (Sazdova et. al. 2009). Активирането на вътреклетъчната сигнална верига води до увеличаване на цАМФ и активиране на ПК А \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK1/2. Прилагането на инхибитори на ПК А (Rp-cAMPS) и на MEK1/2 (U0126) напълно премахват ефекта на обестатина (Sazdova et. al. 2009). Активирането както на ПК А, така и на ERK1/2 фосфорилират ключовия за синтеза на адреналина ензим – тирозин хидроксилаза. Това води до синтеза на нови молекули адреналин и до освобождаването им в синаптичното окончание. Това се потвърждава от липсата на ефект на обестатина в присъствие на приложените от нас инхибитори на тирозин хидроксилазата (3-IT) и на ключови транспортери, от които зависи отделянето на адреналина в окончанието (резерпин и дезипрамин). Освободеният адреналин от варикозните разширения на симпатиковите окончания осъществява мощен контрол върху сърдечната дейност като повишава честотата и силата на сърдечните съкращения. При използвания от нас препарат на изолирано сърце обестатинът се въвеждаше директно в камерата като по този начин се избягваше влиянието върху възбудно-проводната система на сърцето. Това е причината поради, която беше наблюдаван само положителния инотропен ефект на приложения обестатин.

Положителният инотропен ефект на обестатина се реализира чрез активиране на адренергичните рецептори. Взаимодействието на адреналина с адренергичните рецептори показва температурна зависимост както по отношение на рецептора с който ще реагира, така и по отношение на чувствителността на рецепторите към адреналина (Kunos & Nickerson 1976). В температурните условия, при които бяха проведени нашите експерименти (18-22 °C), адреналинът взаимодейства с еднакъв афинитет и с α -, и с β -адренорецепторите (Kunos & Nickerson 1976). Те са G-протеин куплирани рецептори, но фармакологично се разделят на

няколко подтипа – α_1 - и α_2 -подтип и β_1 -, β_2 - и β_3 -подтип съответно. Отделно, α_1 са хетерогенна група и се подразделят на три подтипа (Rang et. al. 2003).

Всички подтипове β -адренорецептори и α_2 -адренорецепторите повлияват сигналния път аденилатциклазата (АЦ) – ПК А, но са куплирани с различни G-белтъци, които активират или потискат активността на АЦ. β_1 - рецепторите се свързват с Gs-белтък и активират АЦ, в следствие на което се повишава концентрацията на цАМФ и се активира ПК А (Rang et. al. 2003, Boron & Boulpaep 2012). А α_2 активират Gi/o-белтък, който потиска АЦ, концентрацията на цАМФ намалява и респективно активността на ПК А също намалява. Освен това β_2 може да превключва от Gs към Gi-белтъци след фосфорилиране на рецептора от активираната вече ПК А (Zamah et. al. 2002). ПК А фосфорилира редица прицелни белтъци в зависимост от типа клетка. В случая със сърцевите клетки фосфорилира L-тип калциеви канали и KCNQ (Kv7) канали (Hille 2001). Както вече бе споменато в литературния обзор, навлизането на калциеви йони от извънклетъчната среда е съществено за съкращението на жабешките кардиомиоцити и силата му е пропорционална на навлезлия отвън калций (Niedergerke 1963). Проведени по-рано експерименти за проверка на участието на този сигнален път в реализирането на ефекта на обестатина показаха, че инхибирането на β -адренорецепторите и на ПК А напълно премахва инотропния ефект на обестатина (Sazdova et. al. 2009).

Проучванията показват, че освен иницирирането на вътреклетъчната верига от събития, активирането на G-протеин куплирания рецептор включва още две събития. Едното е фосфорилиране на активирания рецептор за намаляване на генерирането на втори посредник и второто – интернализация на фосфорилирания β -адренорецептор и ресенситизация чрез дефосфорилиране, което се осъществява от протеинфосфатаза 2А в ранната ендозома (Vasudevan, et al. 2011). След като извънклетъчният сигнал доведе до проява на клетъчен отговор, иницирираният сигнал в клетката трябва да бъде заглушен. Това се постига или чрез ендцитозата на рецептора или чрез десенситизацията му чрез фосфорилиране на β -адренорецептора. Това води до свързване с β -арестин, който физически възпрепятства свързването с G протеин и блокира сигналната верига след рецептора. Този набор от сложни събития и точният

баланс в този процес показва, че рецепторната функция е фино настроен процес. Нарушенията в регулацията на всяко едно от тези събития би довела до промяна на рецепторната функция и вътреклетъчните сигнални събития (Vasudevan et. al. 2011).

Обикновено се смята, че активираните рецептори, свързани с G протеин, бързо се десенситизират за период от минути чрез фосфорилиране и интернализация след многократно или продължително стимулиране. Това преходно активиране на G протеин-свързани рецептори, обаче е в противоречие с много наблюдавани дълготрайни клетъчни и физиологични отговори *in vitro* и *in vivo*. В първични кардиомиоцити и неврони е установено, че катехоламин-активираният β_1 -адренорецептор непрекъснато стимулира аденилатциклазата за синтеза на цАМФ, което продължава повече от 8 часа (Fu et. al. 2014). Така активираните сърдечни β -адренорецептори чрез симпатиковата нервна система осигуряват постоянен съкратителен отговор на сърцето по време на дълги периоди на физическа активност, а стимулирането на β -адренорецепторите в невроните насърчава дългосрочното потенциране, което е от решаващо значение за обучението и паметта. В съгласие с тези функционални резултати, β_1 -адренорецепторите претърпяват минимална интернализация в първични кардиомиоцити след стимулация с агонисти поради ниското му афинитетно свързване към арестин и прикачването му към скелетни протеини като SAP97 в сарколемата (Hu et. al. 2000). Възможността за продължителна стимулация на β -адренорецепторите се потвърждава и от нашите резултати, където екзогенно добавения адреналин проявяваше по-силен ефект при експериментите, при които ефектът на обестатина не е блокиран, в сравнение с тези, при които липсва обестатин-индуцирано освобождаване на адреналин след третиране със съответните инхибитори (таблица 3).

Доказателствата показват, че ROS играят важна роля в медирането на адренергичната функция. Повишеното производство на ROS след активиране на β -адренорецептора чрез НАДФН-оксидазата не само допринася за промяна на сигналите надолу по веригата, но и за обратната връзка, която модулира фосфорилирането и интернализацията на рецептора (Xu et. al. 2011). Тази специфична обратна връзка на ROS е възможна благодарение на тяхната способност за окислителни и

нитрозилиращи модификации на редица регулаторни белтъци, което потенциално може да включва и рецептори (Donoso et. al. 2011). Такава модификация в компонентите на десенситизиращия път на β -адренорецептора е известно, че допринася за промяна на рецепторната функция (Ozawa et. al. 2008). Нитрозилирането на G-протеин куплирани рецепторни кинази потиска фосфорилирането на рецептора и намалява десенситизацията (Vasudevan et. al. 2011). Освен това излагането на съдови гладкомускулни клетки на екзогенен водороден пероксид причинява бързо повишаване на концентрацията на свободен калций в цитозола, предизвикано от активацията на фосфолипаза С λ (ФЛС λ) чрез тирозин киназа-медиран път (González-Pacheco et. al. 2002). ФЛС λ (изоформа на ФЛ С, активирана чрез тирозиново фосфорилиране) е способна да задейства освобождаването на калций в няколко клетъчни системи, като катализира производството на инозитолтрифосфат от мембранни фосфолипиди (Gonzalez-Pacheco et. al. 2000). Активирането на ФЛ С е част от сигналия път на другия подтип адренорецептор – α_1 . Той е куплиран с Gq/11 белтък, който активира ФЛС. Тя е мембранно свързан ензим и разгражда фосфолипида фосфотидилинозитол 4,5-дифосфата до диацилглицерол (ДАГ) и инозитолтрифосфат (ИТФ). Всеки от тези вторични посредници предизвиква съответни клетъчни отговори. ДАГ активира ПК С, която от своя страна фосфорилира съответните й прицелни белтъци. А ИТФ повлиява калциеви канали по мембраната на ендоплазмения ретикулум и индуцира освобождаване на калциеви йони от втретклетъчните депа. Всичките три подтипа α_1 -адренорецептори активират този сигнален път (Graham et. al. 1996). Тази последователност от събития може да обясни повишената сила на сърдечните съкращения при проведените експерименти в присъствие само на 6-ОНДА (фиг. 20 и 22), което е съизмеримо с чистия ефект на пептида (фиг. 13). В комбинация с обестатин обаче 6-ОНДА губи ефекта си върху мускулната тъкан и амплитудата на съкращенията е близка до контролните стойности (фиг. 21 и 23).

VI. ИЗВОДИ

1. В присъствие на 3-IT се редуцира положителният инотропен ефект на обестатина.

2. Везикуларният транспорт и обратното захващане имат съществено значение за адренергичната сигнализация, в присъствие на обестатин. Третирането с резерпин и дезипрамин напълно премахва положителния инотропен ефект на обестатина.

3. Химичната симпатектомия с 6-ОНДА елиминира обестатиновия ефект както в *in vitro* условия, така и след предварително третиране с този токсин.

4. Присъствието на 6-ОНДА повлиява не само ефекта на обестатина върху кардиомиоцитите и симпатиковата адренергична сигнализация, но оказва и неспецифичен положителен инотропен ефект най-вероятно поради генериране на активни кислородни радикали в кардиомиоцитите.

5. Положителният инотропен ефект на обестатина върху препарати от изолирано сърце от жаба се осъществява най-вече чрез активиране секрецията на адреналин от аксоните на симпатиковите вегетативни неврони, разположени в стената на сърдечния мускул.

VII. Приноси

Разработен е фармакологичен подход за идентифициране на прицелната тъкан на физиологични регулации по катехоламин-зависим механизъм чрез изследване на последователното инхибиране на тяхната синтезата, секрецията, обратен захват и на адренергичната инервация върху ефектите на тези медиатори.

Списък с публикации, включени в дисертационния труд

1. **Bilyana Ilieva**, Hristo Gagov, Mariela Chichova, Iliyana Sazdova, Comparison of Catecholamine Physiological Effects in Vertebrates: Systematic Review, *Acta Zool. Bulg.*, 72 (2), June 2020: 171-178
2. **Bilyana Ilieva**, Hristo Gagov, Iliyana Sazdova, Pharmacology of catecholamine biosynthesis and

signalling, Current Topics in Pharmacology, 2020, Vol 24: 1-11

3. **Bilyana Ilieva**, Hristo Gagov, Mariela Chichova, Iliyana Sazdova, Role of autonomic nervous system in the inotropic effect of obestatin, Current Topics in Pharmacology, 2022, Vol 26: 31-37

**Участия в конференции и научни форуми по тематиката на
дисертационния труд**

1. **Bilyana Ilieva**, Iliyana Sazdova, Hristo Gagov, Physiology and pharmacology of catecholamines signaling, International Scientific conference "Kliment's days", 8-9. 11. 2018, Sofia, p 115
2. **Bilyana Ilieva**, Iliyana Sazdova, Hristo Gagov, Effect of obstatin on contractility of excised frog heart after chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine, International Scientific conference "Kliment's days", 8-9. 11. 2018, Sofia, p 114
3. **Bilyana Ilieva**, Iliyana Sazdova, Hristo Gagov, Effect of obestatin on contractility of excised frog heart preparations after treatment with reserpine, Youth scientific conference "Kliment's days, 8.11.2019, Sofia, p 56
4. **Bilyana Ilieva**, Iliyana Sazdova, Hristo Gagov, Effect of obestatin on contractility of excised frog heart preparations after treatment with desipramine, Scientific conference "Kliment's days, 5.11. 2020, Sofia, p 88
5. **Bilyana Ilieva**, Iliyana Sazdova, Hristo Gagov, „Effect of obestatin on maximal force of contraction of excised frog heart after chemical sympathectomy with 3-iodothyrosine“, Scientific conference "100 years since of birth of professor Leon Mitrani, Bulgarian Academy of Sciences, 16. 12. 2021, Sofia